

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

**Е.В.Семелева, Е.В.Блинова, А.Б.Лебедев, М.М.Гераськина,
О.В.Василькина, И.А.Громова, Д.С.Блинов, А.В.Новиков**

СОЕДИНЕНИЕ ДИМЕТИЛФЕНИЛАЦЕТАМИДА, ОБЛАДАЮЩЕЕ АНТИАРИТМИЧЕСКОЙ И АНТИИШЕМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ, ИНГИБИРУЕТ КАЛЬЦИЕВЫЙ ОТВЕТ NMDA-РЕЦЕПТОРА

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П.Огарёва», Саранск*

С целью исследования влияния диметилфенилацетамида аминоэтансульфоната на проводимость кальциевых ионных каналов NMDA-рецепторов как одного из возможных механизмов фармакологического действия проведены опыты на нейроглиальной культуре клеток гиппокампа, полученной из новорожденных линейных крыс Sprague Dawley.

Ключевые слова: диметилфенилацетамида аминоэтансульфонат, NMDA-рецептор, культура клеток, ингибирование, кальций, флуоресценция

To study the effect of dimethylphenylacetamide aminoethansulphonate of the conduction of Ca²⁺-channels of NMDA-receptors as a possible mechanism of pharmacological action, experiments were made on neuroglial culture of hippocamp cells from newborn Sprague Dawley rats.

Key words: dimethylphenylacetamide aminoethansulphonate, NMDA-receptor, cell culture, inhibition, calcium, fluorescence.

Ведущими общими механизмами формирования реперфузионного поражения миокарда и головного мозга являются активация процессов перекисного окисления липидов и образование активных форм кислорода с деградацией липидных и белковых компонентов биомембран, перегрузка клеток и субклеточных структур кальцием, а также формирование воспалительного ответа [7]. В проведенных ранее экспериментальных исследованиях было установлено, что производные диметилфенилацетамида обладают высоким фармакологическим эффектом по профилактике формирования реперфузионных нарушений ритма сердечной деятельности в опытах на различных теплокровных животных [1, 3], а также сердечно-сосудистых последствий реперфузии средней мозговой артерии в опытах на крысах [2]. Установлено также, что они сдерживают активацию перекисных процессов в цитоплазматических мембранах и модифицируют параметры потенциала действия за счет воздействия на потенциал-зависимые натриевые каналы [3]. При этом влияние веществ на активность кальциевых каналов остается до сих пор неизученным. В этой связи целью настоящей работы явилось исследование влияния вещества указанной химической природы на проводимость кальциевых ионных каналов NMDA-рецепторов как одного из возможных механизмов фармакологического действия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Смешанную нейроглиальную культуру клеток гиппокампа получали из новорожденных (P 1-3) ли-

нейных крыс Sprague Dawley в соответствии с ранее описанной методикой [5, 8]. Эксперименты проводили на культурах в возрасте 10 дней *in vitro*. Концентрацию ионов кальция в цитоплазме ($[Ca^{2+}]_i$) оценивали с помощью двухволнового зонда Fura-2. Для окраски клеток гиппокампа использовали эфир Fura-2 AM (Thermo Fisher, США) в конечной концентрации 4 мкМ в растворе Хенкса, содержащем (в мМ): 156 NaCl, 3 KCl, 1 MgSO₄, 1.25 KH₂PO₄, 2 CaCl₂, 10 глюкозы и 10 HEPES (Fisher BioReagents, США), pH 7.4. На каждое стекло с культурой клеток добавляли 200 мкл свежеприготовленного раствора красителя и инкубировали в термостате в течение 40 мин. при 37 °С.

После этого культуру промывали раствором Хенкса и инкубировали 10-15 мин. для завершения дезертификации красителя. Для регистрации уровня кальция в цитоплазме клеток использовали систему анализа изображений Cell Observer (Carl Zeiss, Германия) на базе инвертированного микроскопа Axiovert 200M, оснащенного монохромной CCD-камерой AxioCam HSm и системой высокоскоростной смены возбуждающих светофильтров Ludl MAC5000. Использовали объектив Plan-Neofluar 10×/0.3. В качестве источника возбуждения флуоресценции использовали осветитель с ртутной лампой HBO 103W/2. Для возбуждения и регистрации флуоресценции Fura-2 использовали набор светофильтров Filter set 21HE (Carl Zeiss, Германия) с фильтрами возбуждения BP340/30 и BP387/15, светоделителем FT409 и фильтром эмиссии BP510/90.

Для измерения флуоресценции, круглое покровное стекло с культурой клеток монтировали в специальную измерительную камеру. Объем среды в камере

© Коллектив авторов 2018

Цитировать как: Семелева Е.В., Блинова Е.В., Лебедев А.Б. и др. Соединение диметилфенилацетамида, обладающее антиаритмической и антиишемической активностью, ингибирует кальциевый ответ NMDA-рецептора // Вестник аритмологии, 2018, №92, с. 55-58; DOI: 10.25760/VA-2018-92-55-58.

составлял 0,5 мл. Добавление исследуемых соединений и их отмывку проводили путем замены среды в десятикратном объеме с помощью системы, обеспечивающей перфузию со скоростью 15 мл/мин. Измерения проводили при 28 °С. Серии изображений получали с интервалом 1 кадр в 3 секунды. Полученные временные серии двухканальных изображений (при длинах волн возбуждающего света 340 и 380 нм) обрабатывали в программе ImageJ (США) с программным модулем Time series analyzer. Измеряли амплитуду кальциевых ответов одиночных клеток, выраженную как отношение сигналов флуоресценции Fura-2 при возбуждении 340 и 380 нм.

Аминоэтансульфонат диметилфенилацетамида (в виде субстанции с лабораторным шифром ФС-ЛХТ-317) был синтезирован в АО «ВНЦ БАВ» (Россия). Для идентификации нейронов производили кратковременную (30 с.) деполяризацию с помощью аппликации 35 мМ KCl. Далее, после возвращения цитозольного Ca²⁺ к уровню покоя, производилась замена среды (HBSS + 20 мМ HEPES) в ячейке на безмагниевою и далее производилась аппликация 10 мкМ NMDA (Sigma-Aldrich, Германия) в течение 30 с. с последующей отмывкой полной средой. После этого в эксперименте ставилась пауза 10 минут для восстановления кальциевого гомеостаза нейронов до уровня покоя. В рамках исследования было проведено 4 серии экспериментов: в первой серии сравнили эффективность ФС-ЛХТ-317 в концентрации 10 мкМ с коммерческим антагонистом NMDA-рецепторов с известной активностью - D-AP5 (10 мкМ) [4]. Вторая серия экспериментов была направлена на поиск эффективной подавляющей концентрации ФС-ЛХТ-317. В третьей серии экспериментов исследовали влияние времени инкубирования культуры клеток с ФС-ЛХТ-317 на амплитуду Ca²⁺-ответов нейронов на NMDA. И, наконец, в четвертой серии опытов изучили NMDA-рецептор-опосредованный клеточный ответ на максимальные пороговые концентрации ФС-ЛХТ-317.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первая (контрольная) аппликация 10 мкМ NMDA вызывает увеличение концен-

трации ионов кальция в цитозоле нейронов в безмагниевою среде с амплитудой 0,36. Добавка 10 мкМ D-AP5 на фоне второй аппликации 10 мкМ NMDA после 5 мин. инкубации приводит к подавлению внутриклеточного потока кальция в среднем на 76%. При этом, аппликация NMDA после отмывки от D-AP5 полностью повторяет амплитуду Ca²⁺-сигнала на первую, контрольную, добавку агониста (амплитуда ответа 94% от исходной), что говорит об обратимости действия антагониста (рис. 1а). Инкубация клеток с 10 мкМ ФС-ЛХТ-317 в течение 5 минут практически не влияет на амплитуду Ca²⁺-сигналов нейронов при аппликации NMDA (рис. 1а). Таким образом, исследуемое соединение не является равно эффективным (при одинаковых концентрациях) антагонистом NMDA-рецепторов, в сравнении с коммерческим веществом D-AP5.

Во второй серии экспериментов инкубирование нейронов с 50 мкМ ФС-ЛХТ-317 в течение 5 минут приводило к подавлению амплитуды Ca²⁺-сигналов на NMDA на 17%, увеличение концентрации суб-

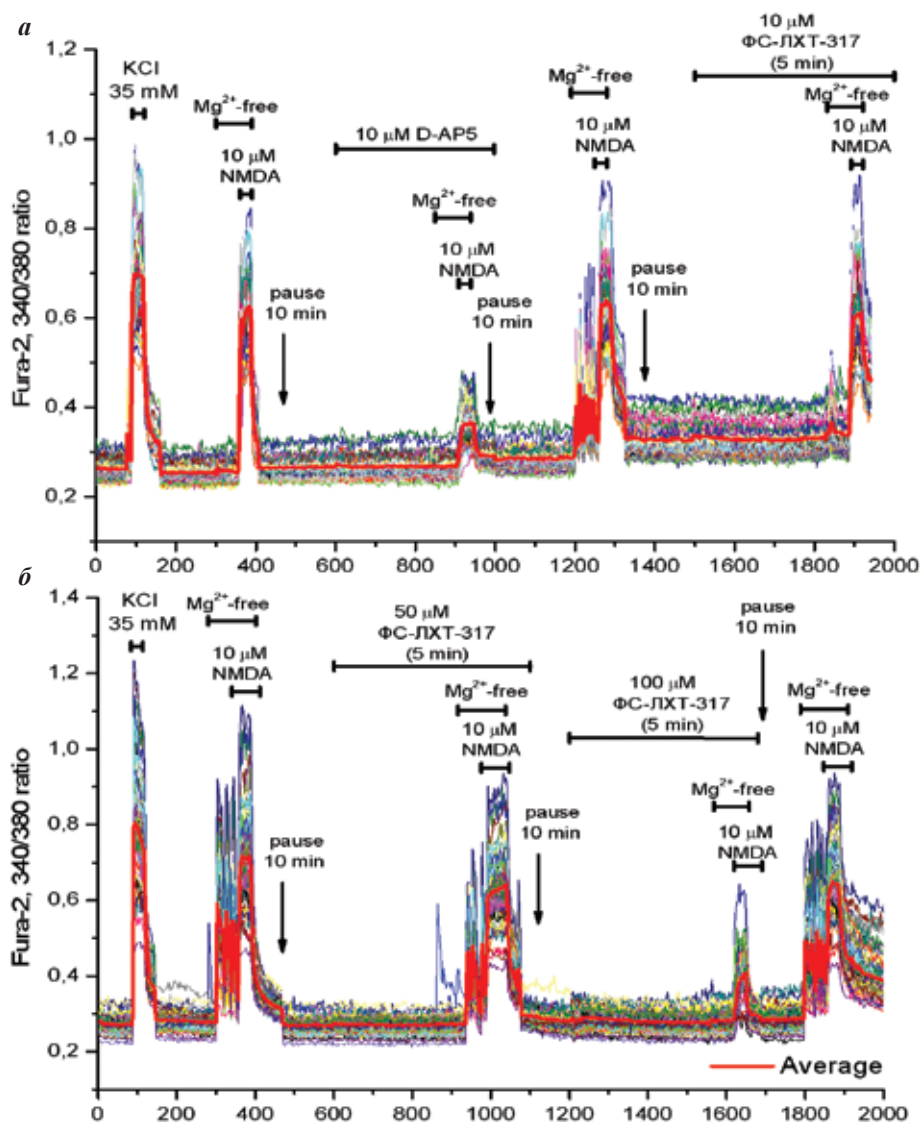


Рис. 1. Записи амплитуды кальциевых ответов одиночных нейронов гиппокампа на фоне аппликации NMDA и воздействия ФС-ЛХТ-317: а - сравнение эффекта вещества с известным антагонистом D-AP5, б - обратимость подавляющего эффекта ФС-ЛХТ-317.

станции вещества до 100 мкМ сопровождалось еще большим подавлением амплитуды Ca^{2+} -ответов - до 65%. Отмывка ФС-ЛХТ-317 приводит к таким же, как и в контроле (первая добавка) по величине Ca^{2+} -ответам нейронов на аппликацию NMDA, что говорит об обратимости действия данного ингибитора (рис. 1б). Интересным действием, которое сопровождается применением ФС-ЛХТ-317, является подавление импульсов нейронов в ответ на снятие магниевого блока при замене среды, что уже говорит об эффективности соединения.

Для ряда соединений, обладающих ингибиторными свойствами на каналобразующие белки, критической является зависимость от времени воздействия вещества, когда увеличение времени инкубации может повышать эффективность ингибирования [6]. Как нами показано, 50 мкМ ФС-ЛХТ-317 в течение 5 минут практически не обладает ингибиторным действием на NMDA-опосредованное увеличение Ca^{2+} -сигналов. При этом, увеличение времени инкубирования в 2 раза (до 10 минут) также не приводило к уменьшению амплитуды Ca^{2+} -сигналов. Таким образом, время инкубирования с ФС-ЛХТ-317 (в пределах до 30 минут) не приводит к проявлению эффектов подавления сигналов.

В четвертой серии экспериментов мы установили, что увеличение концентрации ФС-ЛХТ-317 до 1 мМ приводит к практически полному подавлению (на 73%) сигналов на NMDA. При этом данная концентрация ФС-ЛХТ-317 (и возможно более высокие дозы) может оказывать не полностью обратимые эффекты, т.к. после отмывки от вещества Ca^{2+} -сигналы нейронов не восстанавливаются до уровня контрольной добавки NMDA, что может быть связано с эффектами высоких доз на механизмы десенситизации NMDA-рецепторов.

Таким образом, исследуемое соединение аминоксансульфонатдиметилфенилацетамида (ФС-ЛХТ-317) обладает выраженными ингибиторными эффектами, направленными на подавление активности кальциевых каналов NMDA-рецепторов в концентрациях выше 50 мкМ. Данные ингибиторные эффекты являются обратимыми или частично обратимыми и регистрируются по уменьшению амплитуды Ca^{2+} -сигналов в нейронах при аппликации NMDA в безмагниевого среде, а также по ингибированию Ca^{2+} -импульсов в ответ на исключение магния (снятие магниевого блока) из среды. Следовательно, в основе механизма антиреперфузионного эффекта вещества может лежать его способность ингибировать кальциевые каналы NMDA-рецепторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блинов Д.С., Гогина Е.Д., Скачилова С.Я. и др. Мембранные механизмы антиаритмического действия отечественного цитопротектора этоксида // Вестник аритмологии. - 2011. - № 66. - С. 42-46.
2. Блинов Д.С., Сернов Л.Н., Блинова Е.В. и др. Эффекты этоксида в коррекции сердечно-сосудистых расстройств, обусловленных церебральной ишемией в эксперименте // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2011. - Т. 74, №7. - С. 13-15.
3. Блинова Е.В., Яхья М.Х.С., Василькина О.В. и др. Влияние производных диметилацетамида на некоторые параметры потенциала действия и ионное проведение // Вестник аритмологии. - 2016. - №84. - С. 40-44.
4. Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F. The glutamate receptor ion channels. // Pharmacol. Rev. 1999. Vol. 51, N. 1. P. 7-61.
5. Krogh K.A., Thayer S.A. Calcium imaging to study NMDA receptor-mediated cellular responses // Neuro-methods. 2016. Vol. 106. P. 221-239.
6. Lindström E., von Mentzer B., Pählman I. et al. Neurokinin 1 Receptor Antagonists: Correlation between in Vitro Receptor Interaction and in Vivo Efficacy // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2007. Vol. 322, N. 3. P. 1286-1293
7. Paoletti P., Bellone C., Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease // Nat. Rev. Neurosci. 2013. Vol. 14, N. 6. P. 383-400.
8. Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Kononov A.V., Zinchenko V.P. Short-term episodes of hypoxia induce posthypoxic hyperexcitability and selective death of GABAergic hippocampal neurons // Exp. Neurol. 2013. Vol. 250. P. 1-7.

СОЕДИНЕНИЕ ДИМЕТИЛФЕНИЛАЦЕТАМИДА, ОБЛАДАЮЩЕЕ АНТИАРИТМИЧЕСКОЙ И АНТИИШЕМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ, ИНГИБИРУЕТ КАЛЬЦИЕВЫЙ ОТВЕТ NMDA-РЕЦЕПТОРА

*Е.В. Семелева, Е.В. Блинова, А.Б. Лебедев, М.М. Гераськина, О.В. Василькина,
И.А. Громова, Д.С. Блинов, А.В. Новиков*

С целью исследования влияния диметилфенилацетамида аминоксансульфоната (лабораторный шифр ФС-ЛХТ-317), обладающего антиаритмическим действием на внутриклеточную концентрацию кальция, на проводимость кальциевых ионных каналов NMDA-рецепторов как одного из возможных механизмов его фармакологического действия проведена серия опытов. Методом флуоресцентного имиджинга в 4-х сериях экспериментов на нейроглиальной культуре клеток гиппокампа, полученной из новорожденных линейных крыс Sprague Dawley, сравнили эффективность ФС-ЛХТ-317 с коммерческим антагонистом NMDA-рецепторов D-AP5, оценили эффективную подавляющую концентрацию ФС-ЛХТ-317, исследовали влияние времени инкубирования культуры клеток с ФС-ЛХТ-317 на амплитуду Ca^{2+} -ответов нейронов на NMDA и изучили NMDA-рецептор-опосредованный клеточный ответ на максимальные пороговые концентрации ФС-ЛХТ-317. Установили, что исследуемое соединение аминоксансульфонат диметилфенилацетамида (ФС-ЛХТ-317) обладает выраженными ингибиторными эффектами, направленными на подавление активности кальциевых каналов NMDA-рецепторов в концентрациях выше 50 мкМ. Данные ингибиторные эффекты являются обратимыми или частично обратимыми и регистрируются по уменьшению амплитуды Ca^{2+} -сигналов в нейронах при аппликации NMDA в безмагниевого

среде, а также по ингибированию Ca^{2+} -импульсов в ответ на исключение магния (снятие магниевого блока) из среды. Следовательно, в основе механизма антиреперфузионного эффекта вещества может лежать его способность ингибировать кальциевые каналы NMDA-рецепторов.

DIMETHYLPHENYLACETAMIDE COMPOUND WITH ANTIARRHYTHMIC AND ANTIISCHEMIC PROPERTIES INHIBITS Ca^{2+} -RESPONSE OF NMDA-RECEPTOR

E.V. Semeleva, E.V. Blinova, A.B. Lebedev, M.M. Geraskina,

O.V. Vasilkina, I.A. Gromova, D.S. Blinov, A.V. Novikov

To assess the effect of dimethylphenylacetamide aminoethansulphonate (laboratory name: FS-LHT-317) with antiarrhythmic properties on the intracellular Ca^{2+} concentration and on the conduction of Ca^{2+} -channels of NMDA-receptors as a potential mechanism of its pharmacological action, the series of experiments were made. Using the fluorescent imaging technique in four series of experiments on the neuroglial culture of hippocamp cells from newborn Sprague Dawley rats, the effect of FS-LHT-317 was compared with the effect of commercially available antagonist of NMDA-receptors D-AP5, the effective suppressing concentration of FS-LHT-317 was evaluated, the influence of incubation time of cell culture with FS-LHT-317 on the amplitude of Ca^{2+} -response of neurons to NMDA was assessed, and the NMDA-receptor-mediated cell response to maximal threshold concentrations of FS-LHT-317 was studied.

It was found that dimethylphenylacetamide aminoethansulphonate (FS-LHT-317) has a pronounced inhibitory activity with regard to Ca^{2+} -channels of NMDA-receptors in the concentration of >50 μmol . Other inhibitory effects are reversible or partially reversible; they occurred as depression of neuronal Ca^{2+} -signal amplitude in response to NMDA application in magnesium-deprived environment as well as inhibition of Ca^{2+} -impulse in response to magnesium extension (removal of magnesium block) from the cellular environment. Therefore, the compound ability to inhibit Ca^{2+} -channels of NMDA-receptors may account for the mechanism of its anti-reperfusion effect.